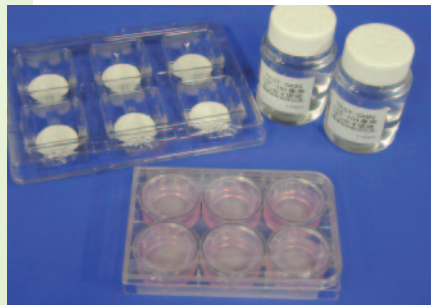
UPLOAD

TOYOBO BIOCHEMICALS

2008 August
VOL. 91

TESTSKIN™ LSE-melano
➡本誌p.1に詳細記事がございます。

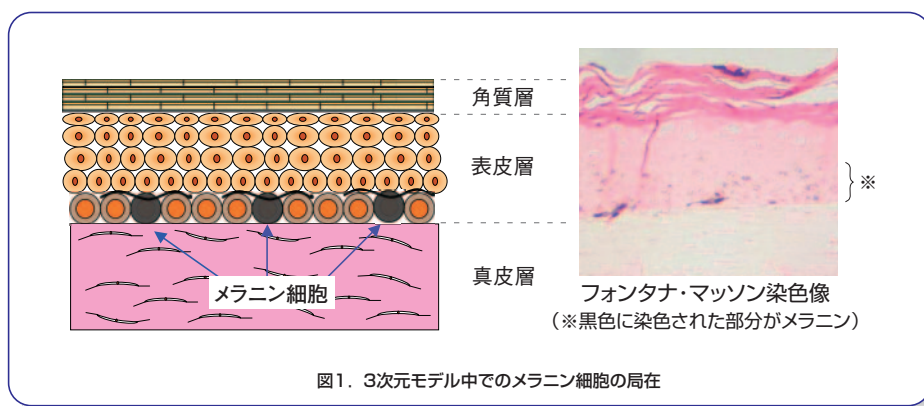
発売記念キャンペーン 30%off

TESTSKIN™ LSE-melano メラニン細胞含有3次元培養ヒト皮膚モデル

■期間：2008年7月4日～2008年11月14日（ご注文分）

メラニン産生細胞を組み込んだ3次元培養皮膚モデルです。美白剤評価等にご使用いただけます。

TESTSKIN™ LSE-melanoは、メラニン細胞（メラノサイト）、表皮角化細胞（ケラチノサイト）を含む表皮層、および線維芽細胞（フィブロブラスト）を含む真皮層から構成された3次元培養ヒト皮膚モデルです。弊社の3次元細胞培養・皮膚構築技術を応用し、メラニン細胞を表皮層の下層部（真皮層との境界付近）に生着させることに成功しました。美白剤の評価、皮膚科学研究等にご利用いただけます。

図1．3次元モデル中でのメラニン細胞の局在

特長1 3次元皮膚モデル

・構造的、生化学的にヒト正常皮膚に近似した3次元培養皮膚モデルです。

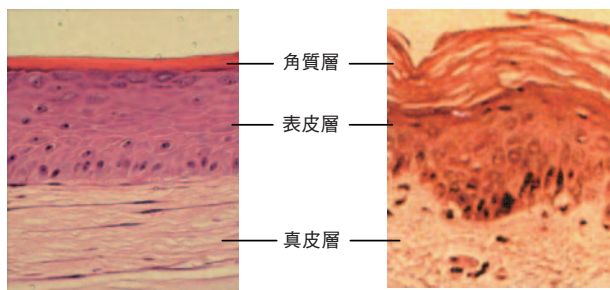
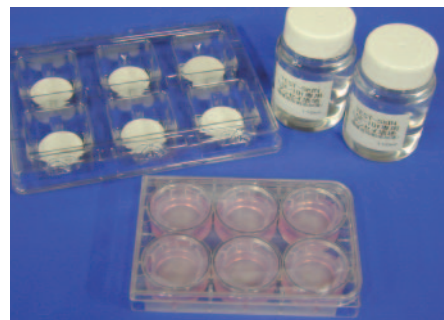



図2．ヒト皮膚との形態比較（HE染色）

特長2 様々な研究で使用可能

・美白剤の評価、皮膚科学研究にご利用できます。

特長3 簡便

・簡便な操作で約14日間のアッセイ培養が可能です。

製品内容

	製品名	数量	説明
①	メラニン細胞入り皮膚モデル（トランスウェル）	6個	皮膚組織はトランスウェル底面のポリカーボネート膜上に付着しています。またトランスウェルは輸送用トレイ内でアガロース上に保持されています。
②	培養用トレイ（6ウェルタイプ）	1枚	皮膚モデル培養に使います。
③	コットンパッド	12枚	培養用トレイに入れ、皮膚モデルの培養に用います。
④	LSE-101用アッセイ培地	110mL×2本	メラニン細胞入り皮膚モデル培養用培地です。

実施例 コウジ酸によるメラニン産生抑制効果の確認

TESTSKIN™ LSE-melanoを用いて、代表的な美白剤であるコウジ酸のメラニン産生抑制効果を確認しました。

実験方法

3%コウジ酸を原則として1日1回、皮膚表面に60μl添加しました（10回/14日間）。対照にはPBSを同様に添加しました。14日目に表皮よりメラニン色素を抽出し、405nmの吸光度を測定してメラニン量を求めました。

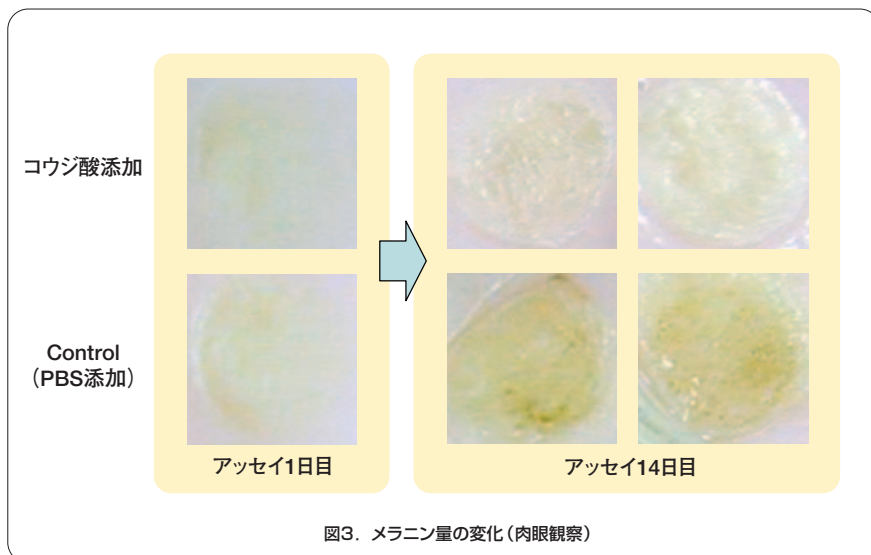



図3．メラニン量の変化（肉眼観察）

図4．トランスウェルの形状

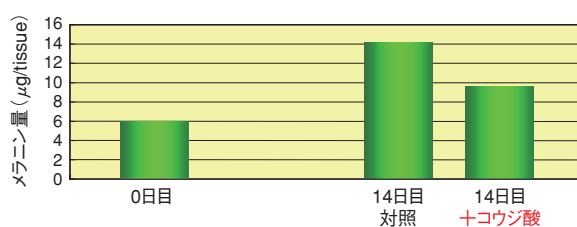



図5．メラニン量の変化（抽出・測定）

結果及び考察

14日間の培養により組織の黒色化が認められましたが、コウジ酸添加により黒色化の抑制が肉眼レベルにおいても観察されました（図3）。実際のメラニン量を組織より抽出して含量を測定したところ、コウジ酸を添加したものは、コントロールに比べ約70%程度にまでメラニンの産生が抑えられたことが分かりました（図5）。

品　　名	包　装	Code No.	通常価格	キャンペーン価格 2008年11月14日【ご注文分】まで
TESTSKIN™ LSE-melano ・メラニン細胞入り皮膚モデル〈6穴〉　（室温）* ・培養用トレイ　（室温） ・コットンパッド　（室温） ・LSE-101用アッセイ培地〈220ml〉　（4℃）	1セット	TMLSE-101	¥75,000	¥52,500

※本商品は受注生産品です。出荷予定日は「出荷予定カレンダー兼注文書」にてご確認ください。
＊ご注文書は弊社ホームページサイドメニュー【ご注文】→【TESTSKIN™・TESTLIVER™】からダウンロードしていただけます。

『KOD FX』を用いたマウステールライセートからの直接PCR

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　杉山 明生

はじめに

『KOD FX』は、様々な優れた特性を有するPCR酵素『KOD DNA Polymerase』をベースに開発された高性能PCR試薬です。本酵素は、優れた「増幅成功率」、「増幅効率」、「伸長性」を示し、幅広いPCRにおいて確実にPCR産物を得ることができます。特に、その「増幅成功率」は、これまでの他のPCR酵素では不可能だったPCRを可能とする点で画期的なものです。例えば、クルードサンプルを鋳型に用いた場合や、GCリッチなターゲットを増幅する場合でも、KOD FXでは、特別な添加剤やサイクルを用いることなく、通常の条件で確実にPCR産物を得ることができます。図1に、全血をそのままサンプルとして増幅を行った例を示します。このように、KOD FXでは、クルードサンプルを直接PCR反応液に加えるような場合においても、十分な増幅を得ることができます。

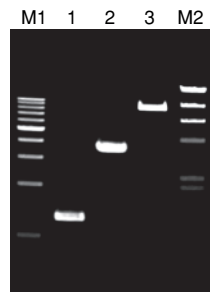



図1．血液サンプルからの直接PCR

今回は、KOD FXのクルードサンプルに強い特長を生かして、マウステールライセートを直接サンプルとして用いて増幅を行った実施例をご紹介します。

方　法

(1) マウステールライセートの調製

マウステールライセートは、マウステール（凍結保存）を図2に示すアルカリ溶解法にて調製しました。本方法では、Proteinase Kを用いる方法と比較して、簡便に短時間でライセートを調製することができます。

なお、本方法ではマウステールは完全には溶解しませんのでご注意ください（完全に溶解させる必要はありません）。また、溶解液の核酸濃度は測定できません。

マウステール約3 mm
↓ ←50 mM NaOH 180 μlを加え、Vortexにて良く攪拌
↓ 95℃, 10 min.インキュベート※
↓ ←1M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μlを加え、Vortexにて良く攪拌
↓ 12,000 rpm, 10 min.遠心
上清回収

（※熱アルカリ溶液の取り扱いに十分ご注意ください。）

図2．マウステールライセートの調製方法（アルカリ溶解法）

(2) PCR反応

PCR反応には、(1) で調製したライセートを原液（×1）として、滅菌水にて10倍、100倍希釈したもの5 μlをサンプル（鋳型）として用い、以下の条件にて実施しました。

●PCR condition

Template:　マウステールライセートの希釈系列（×1, ×10, ×100）5 μl / 50 μl Reaction
Target:　Mouse membrane glycoprotein（Thy-1）gene 2.6 kb（Accession No.:M10246）
Primer#1：　5'-CCACAGAATCCAAGTCGGAACTCTTG-3'（26mer）
Primer#2：　5'-GTAGCAGTGGTGGTATTATACATGGTG-3'（27mer）

①反応液組成

2×PCR buffer for KOD FX	25 μl
2 mM dNTPs	10 μl
10 pmol /μl Primer #1	1.5 μl
10 pmol /μl Primer #2	1.5 μl
マウステールライセート	5 μl
KOD FX（1.0 U/μl）	1 μl
Autoclaved, distilled water	X μl
Total	50 μl

②PCRサイクル*

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec.
68℃, 2.5 min.**
（98℃～68℃：30 cycles）

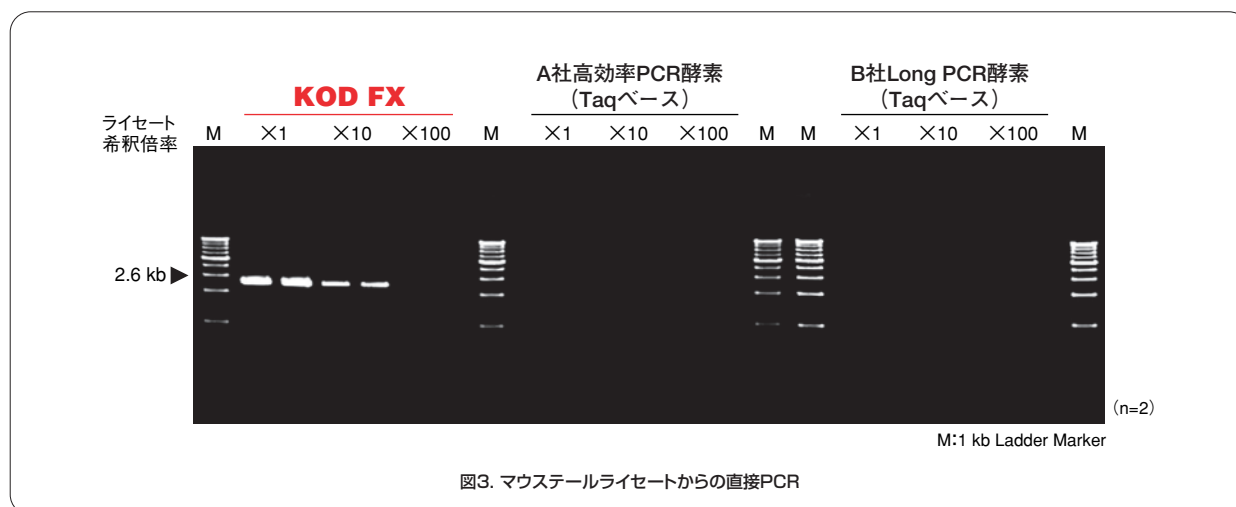
＊プライマーのTm値が73℃未満の場合は、以下の3ステップサイクルを用いることをお薦めします。

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec.
(Tm−5)℃, 30 sec.
68℃, 1 min./kb
（98℃～68℃：30 cycles）

＊＊ 1 min./kbを目安にしてください。

また、比較のためTaqベースの他社PCR酵素を用いて、取扱説明書推奨の条件にてPCRを実施し比較を行いました。

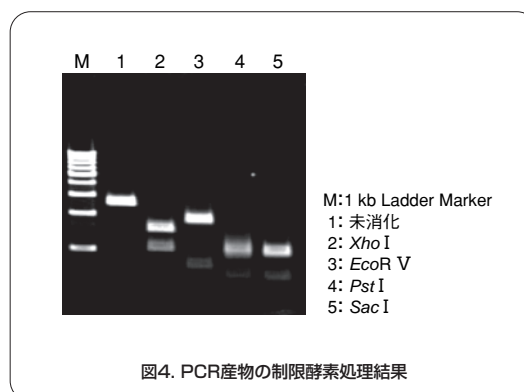
結果及び考察

図3. マウステールライセートからの直接PCR

PCR産物は、1%アガロースゲルに5 μlアプライして解析を行いました(図3)。その結果、KOD FXでは、PCRが阻害されることなく、明瞭な2.6 kbの増幅を確認することができました。また、希釈したサンプルを用いた場合においても十分な増幅が確認できました。

マウステールサンプルからPCRを行う場合、精製したDNAを用いるか、Proteinase Kにより夾雑タンパク質を分解した前処理サンプルを用いてPCRを行うのが一般的です。しかし今回、KOD FXを用いることによって、簡便な「アルカリ溶解法」で調製したクルードサンプルを用いても十分に増幅産物が得られることが分かりました。これは、KOD FXが①クルードサンプルに強いこと、および②増幅効率が大変優れていることによるものと考えられます。

また、本アルカリ溶解法では、熱アルカリ処理のため、長鎖ターゲットが増幅できないことも危惧されましたが、別の実験により、5 kbのターゲットも増幅できることを確認しています。

図4は、ここで得られたPCR産物10 μlに対し、種々の制限酵素1 μl(5〜10units)を加え、37℃で1hr処理後、電気泳動解析した結果を示しています。その結果、ターゲット配列から予想されるサイズの断片が得られることが確認できました。よって、本方法は制限酵素を用いる遺伝子タイピング(PCR-RFLP解析)にも応用可能であることが示唆されました。

図4. PCR産物の制限酵素処理結果

まとめ

以上の検討から、KOD FXを用いることでトランスジェニックマウスの遺伝子解析を簡便化できることが示されました。また本酵素を用いた別の実験において、マウステールに限らず、これまでDNA精製が必要であった培養細胞や血液などからも、直接PCR可能であることが確かめられています。さらに、その他のサンプルにおいても、KOD FXを用いることによって、サンプルをそのまま、あるいは、簡便な前処理を行うのみでPCR実験に用いることができる可能性があると考えられます。多数のサンプルを処理しなければならない場合や、スクリーニング等において大変な思いをされている方は、是非一度、KOD FXをお試しください。その優れた「増幅成功率」に驚かれることと思います。

品名および内容	包　　装	保存温度	Code No.	価　　格
KOD FX KOD FX (1U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX 2mM dNTPs	200U×1本 [200回用*]	-20℃	KFX-101	￥35,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用*]	-20℃	KFX-101X5	￥140,000

＊50 μl反応を行った時の反応回数を表示しています。
※KOD FXで増幅されたDNA断片は平滑化されているため、通常のTAクローニングはできません。TArget Clone™ -Plus-をお使いください。

関連商品

品名および内容	包　　装	保存温度	Code No.	価　　格
高効率TAクローニングキット **TArget Clone™ -Plus-**	10回用	-20℃	TAK-201	￥16,000

CELL APPLICATIONS, INC.
ヒト骨/関節系細胞
30%OFFキャンペーン

創薬研究に有用な、ヒト骨/関節系細胞、キット及び培地を対象に30%OFFにてご提供いたします。

期間：2008年9月1日～2008年11月28日（ご注文分）

CELL APPLICATIONS, INC.では、様々な初代細胞、Total RNA、抗体を扱っております。(詳細はこちらをご覧ください。http://www.cellapplications.com/)

初代細胞は、生体に近い機能を保持しており、今回ご案内しております骨/関節系細胞は、細胞分化や関節炎、サイトカイン等の研究に用いられています[1)-5)]。

1）Y. Wada et al. *Int Immunopharmacol.* **6**: 144-55 (2006)
2） T. Ando et al. *Arthritis Res. Ther.* **8**: R146. (2006)
3） J. Quintavalla et al. *J. Cell Physiol.*, **204**: 560-6 (2005)
4） H. S. Cha et al. *Arthritis. Rheum.*, **54**: 587-92 (2006)
5） J. Lu et al. *J. Infect. Dis.*, **193**: 582-90 (2006)

滑膜細胞（ノーマル）

品名		包装	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
ヒト軟骨細胞（HC）凍結細胞	adult	1vial	CA40205a	¥109,000	¥76,300
ヒト軟骨細胞（HC）凍結細胞	fetal	1vial	CA40205f	¥111,000	¥77,700
ヒト軟骨細胞（HC）Total Kit	adult	1Kit	CA402K05a	¥141,000	¥98,700
ヒト軟骨細胞（HC）Total Kit	fetal	1Kit	CA402K05f	¥144,000	¥100,800
ヒト骨芽細胞（HOb）凍結細胞	adult	1vial	CA40605a	¥110,000	¥77,000
ヒト骨芽細胞（HOb）凍結細胞	fetal	1vial	CA40605f	¥114,000	¥79,800
ヒト骨芽細胞（HOb）Total Kit	adult	1Kit	CA406K05a	¥145,000	¥101,500
ヒト骨芽細胞（HOb）Total Kit	fetal	1Kit	CA406K05f	¥146,000	¥102,200
ヒト滑膜細胞（健常人由来, HFLS）凍結細胞	adult	1vial	CA40805a	¥131,000	¥91,700
ヒト滑膜細胞（骨関節炎患者由来, HFLS-OA）凍結細胞	adult	1vial	CA408OA05a	¥131,000	¥91,700
ヒト滑膜細胞（慢性関節リウマチ患者由来, HFLS-RA）凍結細胞	adult	1vial	CA408RA05a	¥131,000	¥91,700
ヒト滑膜細胞（健常人由来, HFLS）Total Kit	adult	1Kit	CA408K05a	¥169,000	¥118,300
ヒト滑膜細胞（骨関節炎患者由来, HFLS-OA）Total Kit	adult	1Kit	CA408OAK05a	¥169,000	¥118,300
ヒト滑膜細胞（慢性関節リウマチ患者由来, HFLS-RA）Total Kit	adult	1Kit	CA408RAK05a	¥169,000	¥118,300
ヒト軟骨細胞基本培地		500ml	CA410500	¥13,000	¥9,100
ヒト軟骨細胞増殖培地（基本培地＋添加剤）		500ml	CA411500	¥23,000	¥16,100
ヒト軟骨細胞分化培地		250ml	CA411D250	¥20,000	¥14,000
ヒト滑膜細胞基本培地		500ml	CA414500	¥13,000	¥9,100
ヒト滑膜細胞増殖培地（基本培地＋添加剤）		500ml	CA415500	¥26,000	¥18,200
ヒト骨芽細胞基本培地		500ml	CA416500	¥13,000	¥9,100
ヒト骨芽細胞増殖培地（基本培地＋添加剤）		500ml	CA417500	¥26,000	¥18,200
ヒト骨芽細胞分化培地		250ml	CA417D250	¥15,000	¥10,500

※1. Total Kit には、各細胞1vial, 各細胞用増殖培地、サブカルチャー試薬セット（A）（CA090K）が含まれます。細胞1vial には、5×10^5cells が含まれます。サブカルチャー試薬セット（A）には、ハンクス緩衝液、トリプシン-EDTA溶液、トリプシン中和液が各100ml 含まれます。
※2. 保存温度は、細胞：液体窒素、培地、サブカルチャー試薬セット（A）：-20℃です。
※3. 本細胞は、HIV、HBV、HCV、マイコプラズマ、酵母、真菌陰性が確認されています。

私にも できた!

LIFE SCIENCE SERIES

ライフサイエンス実験シリーズ Vol.6

PCR実戦技術編(2)

本シリーズは、市販のノウハウ本や実施例集ではカバーできなかったようなライフサイエンス実験のコツなどについて、弊社研究員の実験ノートなども参考に、生の事例を交えながら、紹介させていただいています。前号から、最もリクエストの多かったPCR関連技術をさらに深くご紹介する目的で、「PCR実戦技術編」をお届けしています。

前号では、Sリーダーから難問が出題され、その問題をめぐって、A子さんとライバルのN代さんとのバトルの予感が漂っていましたが…。皆さんも是非、前号で2人の設計したプライマー配列を確認してから、本号を読み進めてください。

前号の課題ダイジェスト

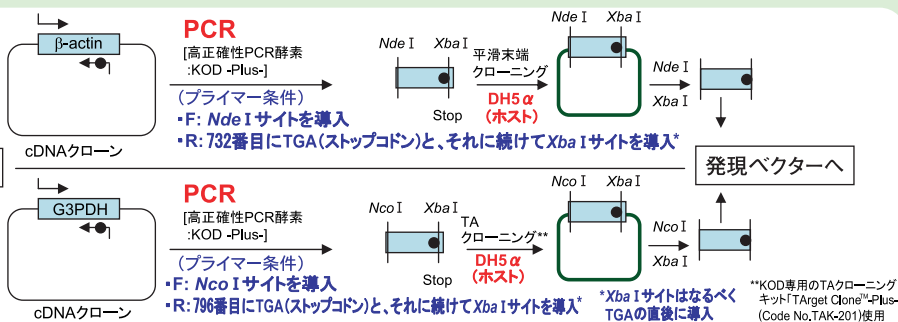



図1 前号の2人への課題

図2・3に、A子さんとN代さんの設計したPCRプライマーを示します。皆さんならどういうプライマーを設計しますか?

ヒント
①Damメチラーゼの認識配列は「GATC」で、*Xba* I はその影響を受けます。
②ORFの配列を再確認!

```
        5' GCTCCATATGGATGATGATATCGC 3'  →
                NdeI      BACT-F
1   ・・・・CGCCGCCAGCTCACCATGGATGATGATATCGCCGCGCTCGTCGTC
                       M  D  D  D  I  A  A  L  V  V
・ ・ ・ ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ・ ・・・・・

                     732
・・GAGCAAGAGATGGCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTA・
    E  Q  E  M  A  T  A  A  S  S  S  S  L  E  K  S
  ←  3' GATGGCCACGGCTTGATCTAGATCC 5' *
                     STOP XbaI
               BACT-R
```
*実際のプライマー配列はこの相補配列になります。

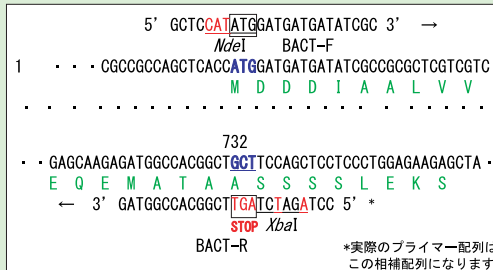



図2 A子さんの設計したPCRプライマー(β-actin遺伝子)

```
        5' ACCCATGGGGAAGGTGAAGGT 3'  →
              NcoI      G3PDH-F
1   TCGCTCAGAACACCTATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC・・・・
                   M  G  K  V  K  V  G  V  N
・ ・ ・ ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ・ ・・・・・

                              796
・・・・CTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTG・・
     C  R  L  E  K  P  A  K  Y  D  D  I  K  K
          ←  3' ACCTGCCAAATGAGATTCTAGAAAGAAGG 5' *
                          STOP   XbaI
                        G3PDH-R
```
*実際のプライマー配列はこの相補配列になります。

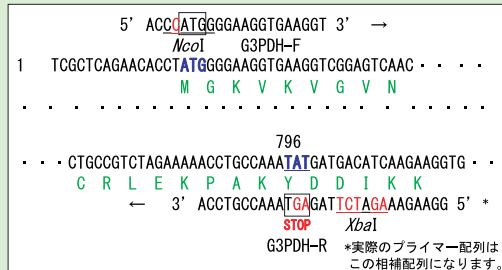



図3 N代さんの設計したPCRプライマー(G3PDH遺伝子)

注意!! 上の二人の解答には間違いが含まれている可能性があります。

本シリーズは、弊社ウェブサイト(http://www.toyobo.co.jp/bio)の「実験お助けコーナー」でご覧いただけます。

今までの登場人物

Sリーダー 冷静沈着なライフサイエンスグループのリーダー

A子さん 今年入社4年目になる研究員

N代さん 今年入社3年目になる研究員(A子さんのライバル)

S本さん アシスタント

1 遺伝子組換え実験の落とし穴いろいろ

PCRやその周辺技術が発達し、本当に様々な実験ができるようになりました。しかし、原理をきちんと考えて実験しないと、思わぬ失敗をしてしまうことがあるようです。今回は、その中でも陥りがちな実験の『落とし穴』についてご紹介しようと思います。

1-1 サイトあれども切り出せず

制限酵素を発現している細菌は、同じサイトを認識しメチル化する制限メチラーゼを発現して自身のDNAを保護しています。このような菌に、メチル化を受けていないファージのDNAなどが侵入するとバラバラに切断を受けてしまうというわけです。これがいわゆる「制限現象」です。ただ、日常の実験ではこのような制限系を有する菌を用いることは無いので、特に困っている方は少ないと思います。

一方、通常の組換え実験に用いるJM109やDH5αなどのほとんどの大腸菌に発現しているDamメチラーゼやDcmメチラーゼに関しては注意が必要です。DamメチラーゼはGATCサイトのアデニンのN6を、DcmメチラーゼはCCWGG（W:A or T）サイトの2番目のシトシンのC5をメチル化します（図4）。よって、これらのメチル化によって切断を阻害される制限酵素が存在することに注意しなくてはなりません。

例えば、Damメチラーゼの認識サイトと同じGATC配列を認識する*Mbo* Ⅰは、一般的な組換え実験で用いられる大腸菌で調製されたプラスミドのGATCサイトを切断することができません。また、認識配列のコア部分にDamメチラーゼの認識サイトを含む*Bcl* Ⅰ（認識サイト:TGATCA）も100%切断を阻害されてしまいます。同様に、Dcmメチラーゼの認識サイト:CCWGGを認識する*Eco*RⅡも一般的な大腸菌から調製されたプラスミドを切断することができません。しかし、このような制限酵素はマルチクローニングサイトなどに用いられることはありませんし、あまり問題になることは少ないといえます。

最も注意が必要なのは*Xba* Ⅰなどの制限酵素です。例えば、*Xba* Ⅰの認識サイトはTCTAGAであり、一見、メチラーゼの認識サイトがないように思われます。そこが落とし穴です。このサイトの前にGA、もしくは後にTCの配列がくるとDamメチラーゼの認識サイトができてしまいます。実際に、このサイトは図5のようにメチル化され、*Xba* Ⅰは阻害されてしまいます。この他にも、*Aat* Ⅰ（認識サイト:AGGCCT）や*Ban* Ⅲ（認識サイト:ATCGAT）など、様々な酵素において、同様に前後の配列によってはメチル化サイトが生成され、切断の阻害が起こります。制限酵素のメチル化による阻害に関しては、弊社総合カタログ2008/2009の3-41ページに詳しい表が載っていますので、一度ご確認ください。また、メチル化の阻害を受けない制限酵素もありますので、あわせてチェックしてみてください。

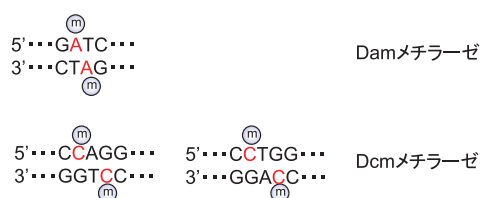



図4 Dam、Dcmメチラーゼのメチル化サイト

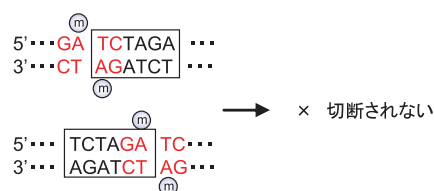



図5 切断阻害を受ける*Xba* Ⅰ サイト

1-2 できるかな? ライゲーション

DNAの各塩基間の結合はリン酸ジエステル結合であり、切断を受けた場合、リン酸基は5'末端か3'末端のどちらかにくることになります。制限酵素で切断を受けたDNAの末端は、*Nci* Ⅰなどの特殊なものをのぞいて、ほとんどの場合5'末端にリン酸基、3'末端に水酸基がくることが分かっています（図6）。

一方、T4 DNAリガーゼなどのライゲーション反応は、ATPのエネルギーを用いる制限酵素反応の逆反応のようなものであり、反応が成立するにはDNA断片の5'末端にリン酸基が存在することが必須条件です（図6）。

前号〔PCR実践技術辺（1）〕でご紹介しましたが、脱リン酸化

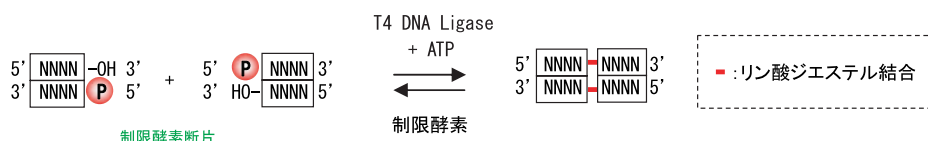
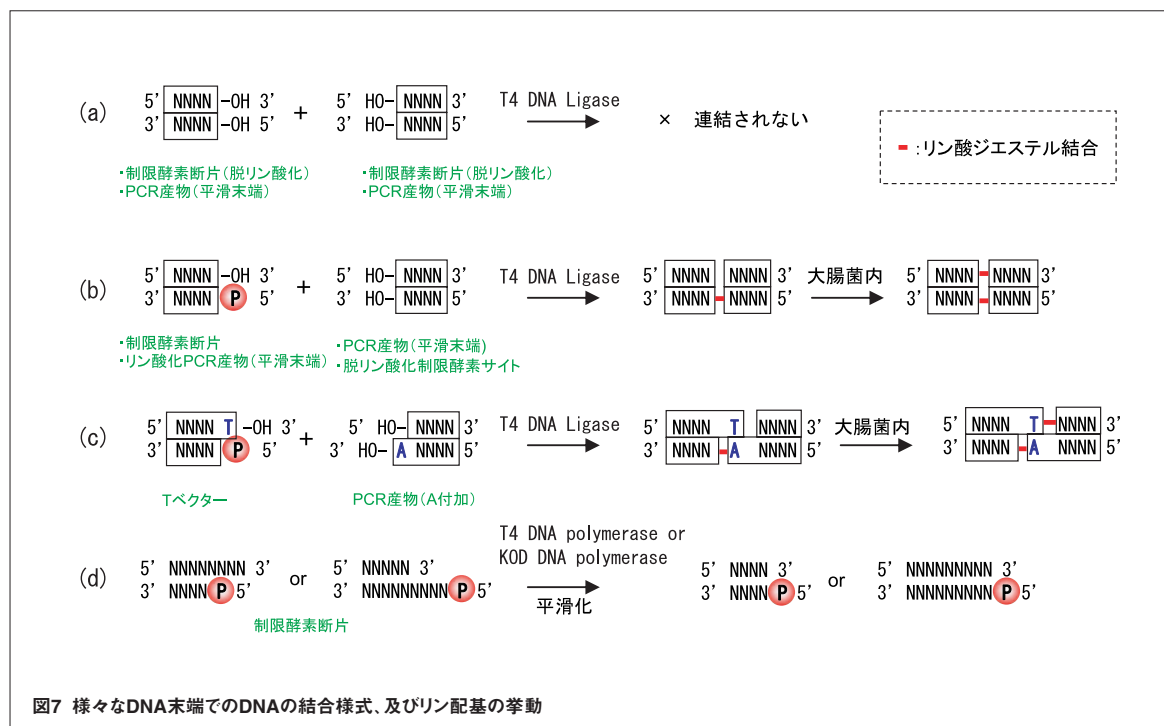



図6 制限酵素、ライゲーションにおけるリン酸基の行方

された制限酵素サイトや通常のプライマー（リン酸化されていない）で増幅されたPCR産物は、5'末端にリン酸基が存在しないためDNAリガーゼで結合することができません（図7a）。しかし、どちらか一方でもリン酸基が存在すると、2本鎖のうちの片方が連結され、さらに大腸菌に導入された後、大腸菌の修復機能が働いてもう片方の結合も形成されます（図7b、c）。脱リン酸化されたベクターへのインサートの挿入やTAクローニングなどがこの例になります。ちなみに、リン酸化されたPCR産物を用いてTAクローニングを行うと効率が向上しますが、それは2本鎖DNAの両側が連結されるためであると考えられます。

また、制限酵素切断末端をポリメラーゼを用いて平滑化することがありますが、5' 突出でも3' 突出でも、その時にリン酸基が削られてしまうことはありません（図7d）。

リン酸基の位置や平滑化反応の方向性は、混乱しやすいですので、この際に一度確認しておくことをお薦めします。

図7　様々なDNA末端でのDNAの結合様式、及びリン配基の挙動

1-3 PCR産物の効率的な加工方法は？

PCR産物の末端がリン酸化されていないことから生じる平滑末端クローニングにおけるトラブルに関しては、前号〔PCR実践技術編（1）〕でご紹介させていただきました。それに加えて、DNA末端の制限酵素サイトの切断性なども気になるところです。実際、制限酵素によっては、末端サイトの切断性が極端に低くなるものも存在するようで注意が必要です。通常は、1塩基程度の余分な配列をプライマーの5'末端に付加することで解決することが多いようですが、2塩基以上必要な制限酵素もあるようです。表1に、代表的な制限酵素の情報をまとめましたので、参考にしてください。

また、両端を効率的に同時に切断したいとか、コンパーチブルサイト（切断面が同一配列で連結可能なサイト）などを知りたいなどの要望もあるかと思いますので、表に加えさせていただきました。ちなみに、コンパーチブルサイト同士で連結したサイトは、再切断できなくなるので注意してください。

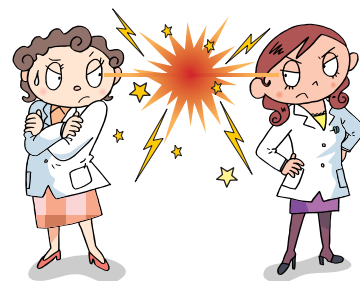
また、この表にはDam・Dcmメチラーゼの影響に関しても載せていますが、PCR産物は全くメチル化を受けていないため、メチル化の影響は考慮する必要はありません。クローニングする際のベクター切断の参考にしてください。

表1　制限酵素対応表

<table>
<tr><th rowspan="2">制限酵素</th><th rowspan="2">認識・切断サイト</th><th colspan="3">各Buffer中での切断性*</th><th rowspan="2">推奨Buffer</th><th rowspan="2">末端切断性**</th><th rowspan="2">Dam・Dcmメチラーゼの影響</th><th rowspan="2">Compatible site</th></tr>
<tr><th>L</th><th>M</th><th>H</th></tr>
<tr><td>BamHI</td><td>G | GATCC</td><td>D</td><td>C</td><td>A</td><td>H</td><td>○</td><td>-</td><td>Bgl II</td></tr>
<tr><td>Bgl II</td><td>A | GATCT</td><td>D</td><td>C</td><td>A</td><td>H</td><td>○</td><td>-</td><td>BamHI</td></tr>
<tr><td>EcoR I</td><td>G | AATTC</td><td>B</td><td>A</td><td>A</td><td>H</td><td>○</td><td>-</td><td></td></tr>
<tr><td>EcoR V</td><td>GAT | ATC</td><td>D</td><td>B</td><td>A</td><td>H</td><td>○</td><td>-</td><td>Blunt Site</td></tr>
<tr><td>Hind III</td><td>A | AGCTT</td><td>C</td><td>A</td><td>D</td><td>M</td><td>▲</td><td>-</td><td></td></tr>
<tr><td>Kpn I</td><td>GGTAC | C</td><td>A</td><td>C</td><td>D</td><td>L</td><td>○</td><td>-</td><td></td></tr>
<tr><td>Nco I</td><td>C | CATGG</td><td>C</td><td>B</td><td>A</td><td>H</td><td>○</td><td>-</td><td></td></tr>
<tr><td>Not I</td><td>GC | GGCCGC</td><td>D</td><td>C</td><td>A</td><td>H</td><td>○</td><td>-</td><td></td></tr>
<tr><td>Pst I</td><td>CTGCA | G</td><td>C</td><td>C</td><td>A</td><td>H</td><td>▲</td><td>-</td><td></td></tr>
<tr><td>Sal I</td><td>G | TCGAC</td><td>D</td><td>D</td><td>A</td><td>H</td><td>▲</td><td>-</td><td>Xho I</td></tr>
<tr><td>Spe I</td><td>A | CTAGT</td><td>C</td><td>A</td><td>B</td><td>M</td><td>○</td><td>-</td><td>Xba I</td></tr>
<tr><td>Xba I</td><td>T | CTAGA</td><td>D</td><td>A</td><td>C</td><td>M</td><td>○</td><td>配列によりDamの影響を受ける</td><td>Spe I</td></tr>
<tr><td>Xho I</td><td>C | TCGAG</td><td>C</td><td>B</td><td>A</td><td>H</td><td>○</td><td>-</td><td>Sal I</td></tr>
</table>

*【酵素の切断性】 A: 100～80%, B:80～50%, C:50～20%, D:20～0%
**【末端切断性】　○:1～2塩基程度の付加で良好な切断性を示す, ▲:2～3塩基以上の付加が必要
<参考文献> *Biotechniques*, 19: 56-59 (1995)

2 実戦－その2－

A子さんとN代さんはT社バイオ研究所のライフサイエンス試薬開発グループの研究員です。今週2人は、わき目も振らずせっせと実験を行っています。そういえば、2人にはSリーダーから難問が課せられているのでした（本シリーズ前号、もしくは本号表紙の前号の課題ダイジェスト参照;本シリーズは弊社ウェブサイトhttp://www.toyobo.co.jp/bioでご覧いただけます）。

2-1 A子さんの落とし穴

2人とも注文していたプライマーが到着するとすぐに実験を開始しました。

2人はまずそれぞれのcDNAが挿入されたプラスミドクローンを鋳型として、高正確性PCR酵素:KOD -Plus-を用いて目的配列を増幅しました。その結果、少し無理のあるプライマーでしたが、鋳型がプラスミドということもあり、きれいに増幅することができました。その後、2人はその増幅産物を、それぞれ平滑末端クローニングとTAクローニングのプロトコール（前号参照）に従って指定されたプラスミドにサブクローニングを行いました（図8）。

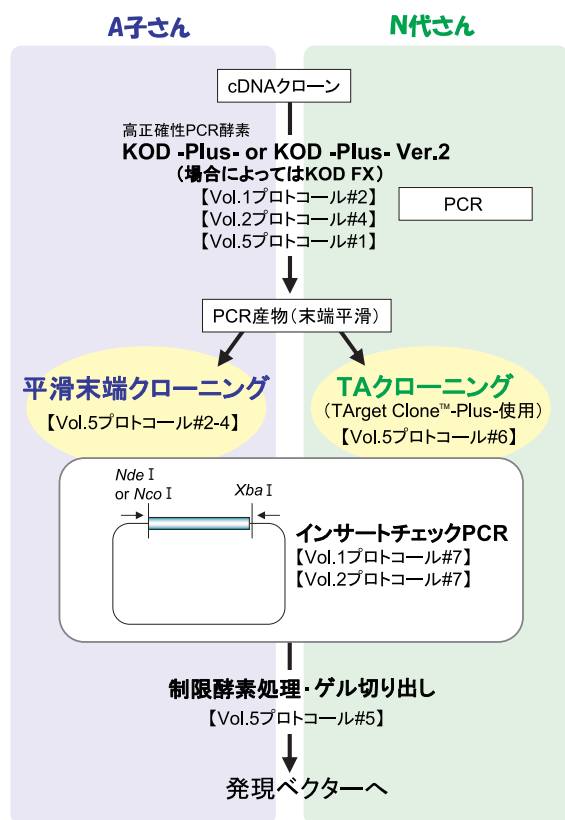



図8 A子さんとN代さんの戦略

翌日、2人はPCRを用いてインサートの有無を確認すると、その増幅産物を使ってそのままシーケンス確認まで済ませてしまいました。2人の手際はたいしたものです。

今日は、先日から培養しておいた大腸菌から目的プラスミドを精製し、指定のあった制限酵素を用いてインサートを切り出し、発現ベクターにインサートを移し変える予定です。

午後、インサートの切り出しをしていたA子さんが浮かない顔をして暗室から出てきました。目的の位置にバンドが無いのです。ワンカットは入っているようですが、明らかにどちらかの制限酵素での切断がうまくいっていないようです。その横でN代さんはそ知らぬ顔でゲルからインサートを切り出しています。

よく調べると、A子さんが作製したクローンの*Xba* I サイトはDamメチラーゼの認識サイトが生じるような配列になっていました（図9）。しかも、ご丁寧に配列の両側にそのサイトが仕込まれていたようです。A子さんは、一般的な大腸菌株（DH5α）を用いてプラスミド調製を行っていましたので、このサイトは明らかにメチル化を受けているはずです。A子さんは、図9に示すBACT-R2のようなプライマーを設計する必要があったのです。A子さんは、自分の無知さ加減にしばし自己嫌悪に陥ってしまいました。

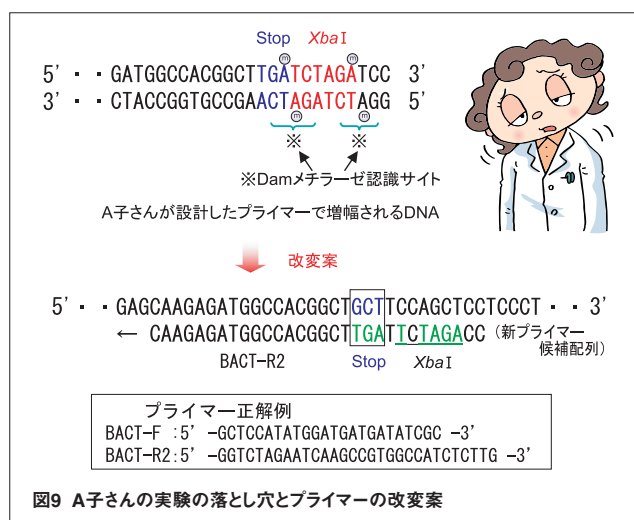



図9 A子さんの実験の落とし穴とプライマーの改変案

しかし、転んでただで起きるA子さんではありません。彼女はこの状態からすぐにリカバーできる方法を考え出しました（図10）。A子さんの考え出した方法は、今回得られたプラスミドを鋳型として、インサート確認用のプライマー（ベクター上に設計）を用いて増幅を行い、その増幅産物を制限酵素処理した後、発現ベクターにつなぎかえるというものです。PCR産物はメチル化などの修飾を受けていないので、メチル化サイトがあっても問題なく切り出すことができるのです。この場合、もう一度PCRエ

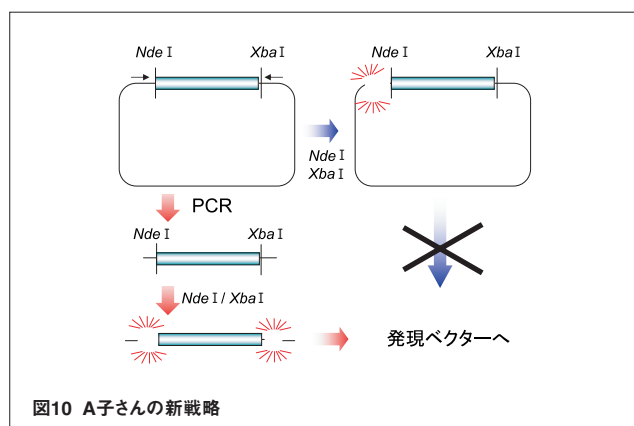



図10 A子さんの新戦略

ラーが無いかをシーケンスにより確認しなければならず、インサートは結局発現ベクターから切り出すことができなくなってしまうのですが、少なくともタンパク質発現実験はできるはずです。

ワンポイントアドバイス ①

前後の配列によって認識配列にメチル化サイトが生じてしまい、切断が阻害されてしまう制限酵素には気をつけましょう。弊社総合カタログ2008/2009 p3-41にそのリストが掲載されていますので、是非一度ご確認ください。

一方、PCR産物は当然ながら何の修飾も受けていませんので、PCR-RFLP実験などを行う場合には心配無用です。

2-2 N代さんの落とし穴

実を言うと、N代さんは学生時代に今回のA子さんと同様の失敗を経験したのでした。

それを考慮して、今回N代さんは終止コドンから3塩基も離れた場所に*Xba* I サイトを設計したのです。N代さんに与えられた問題にも、Damメチラーゼのメチル化サイト（GATC）が数多く仕掛けられていました。しかも、終止コドンの直近はともかく、*Xba* I サイトを1つ離した場合も、2つ離した場合も*Xba* I サイトの前後のどこかに必ずGATC配列ができるようになっていました。N代さんは、Sリーダーの仕込んだ落とし穴の巧妙さに少しビックリしてしまいました。「天然の配列の中に、こんなサイトがあるなんて････」（図11）。

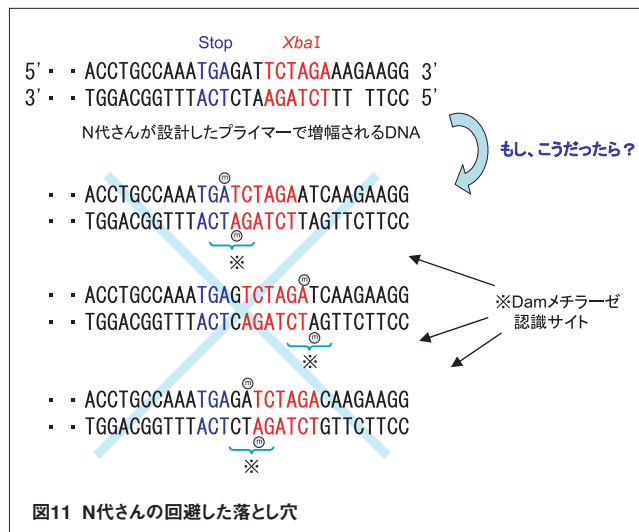



図11 N代さんの回避した落とし穴

その後、N代さんは一気にタンパク質発現実験まで終えてしまいました。しかし、発現させたタンパク質の分子量が少し変です。。。

ワンポイントアドバイス ②

組換え後のDNAの配列はきちんと調べておきましょう。特に、制限酵素サイトはきちんと調べておかないと大変なことになることがあります。また、DNAの接合部に思わぬ配列が形成されていることもトラブルの元になるようですので、気をつけて。

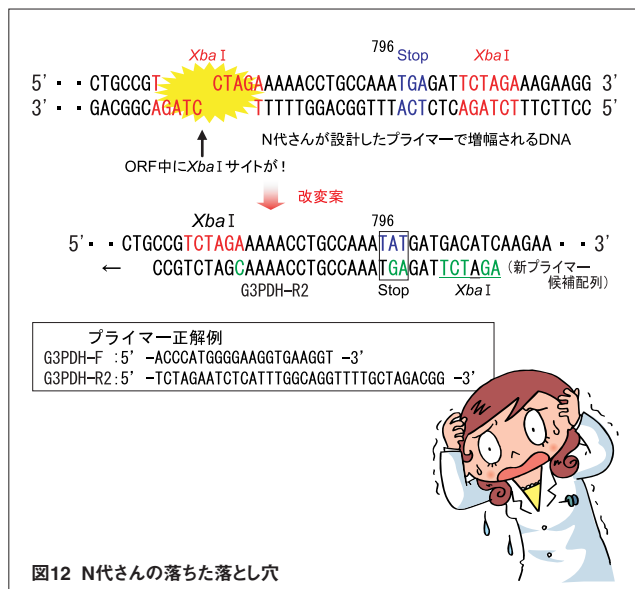



図12 N代さんの落ちた落とし穴

あろうことか、N代さんの増幅した遺伝子のORF中に*Xba* I サイトがあったのです（図12）。N代さんはDamメチラーゼサイトのことに気を奪われて最も基本的なチェックを怠ってしまったのでした。ゲルからDNAを切り出すときも、全く気づきませんでした。当然、N代さんのクローニングした断片には終止コドンがなく、その後に偶然終止コドンがでてくるまでベクターの配列が翻訳された変なタンパク質として発現されたのでした。分子サイズがおかしいはずです。

実は、A子さんは同様なミスを過去におかしたことがあり、今回、自分の配列に加えてN代さんの配列についても組換え後にできる配列についてシミュレーションしていました。A子さんは、N代さんのミスに気づいていたのです。メチル化サイトには気づきませんでしたが。

結局、N代さんは、図12に示したようなプライマー（G3PDH-R2）を作り直しました。このプライマーは、上流側の*Xba* I サイトに変異を入れて、*Xba* I サイトが潰れるようになっています。

この勝負引き分けといったところでしょうか。

ワンポイントアドバイス ③

Nco Iや*Nde* Iなど、開始コドン（ATG）を認識サイトに含む制限酵素は、開始コドン付近でDNAを切り出す場合に重宝することが多いです。特に、*Nde* Iは2番目のアミノ酸に左右されることなくサイトを設計できるので、便利です。

ワンポイントアドバイス ④

プライマーへの変異は、なるべくプライマーの5'側に導入する必要があります。それは、3'側に近すぎるとミスマッチによってポリメラーゼが作用しにくくなるという理由と、3'→5' Exonuclease活性（校正活性）のあるポリメラーゼの場合はこのミスマッチが校正されてしまう可能性があるという理由からです。

ですから、図12のRプライマーのように3'末端付近に変異を導入する場合は、考えられる限り3'末端から離して設計する必要があります。少なくとも4～5塩基以上は離して設計した方が無難です。

KOD FX 活動報告 2.　クルードサンプルからのPCR

最近、細胞などを直接サンプルとして用いるPCR法が注目を集めているようです。そこで今回は、様々なクルードサンプルを直接用いるPCRについて、高成功率PCR酵素『KOD FX』を用いて調べた結果をご紹介します。

KOD FXは、高いPCR成功率を念頭において開発されたPCR酵素です。特に、クルードサンプルやGC含量の偏ったテンプレートからの増幅に力を発揮します。正確性はTaqの約11倍程度です。

●培養細胞を用いた直接PCRの検討

動物細胞の培養が盛んに行われていますが、それらの細胞から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行うケースもしばしば生じるようです。ここでは、そのような場合を想定して、培養細胞をそのまま鋳型にしてPCR可能かどうかについて検討を実施しました。

PCRは、基本条件に準じ、図13に示したプライマーを用いて行いました。サンプルとしては、ヒト細胞株(Jurkat細胞)の培養液($2×10^4$cells 相当)を直接反応系に添加し、ボルテックスミキサーにて攪拌後、2ステップサイクルの条件で増幅を行いました。その結果、1.3〜8.5 kbまでの断片を増幅することができました(図14)。

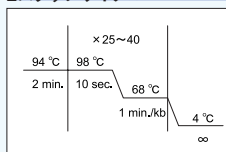
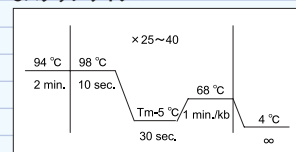
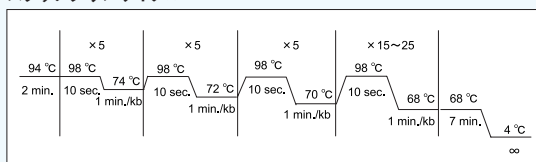
●血液を用いた直接PCRの検討

EDTA採血したヒトの血液を直接鋳型として、上記同様の条件を用い、PCRを行いました。その結果、KOD FXを用いることで、1〜4 μlまで血液を添加したものすべてで1.3 kbの増幅を認めることができました。一方、A社のPCR酵素を用いた検討でも増幅は認められましたが、4 μl添加において明らかな増幅阻害がみられました。それとは対照的に、KOD FXを用いた場合には、血液量に従って増幅量が増加することが確認できました。このことは、KOD FXが、血液の阻害をほとんど受けていないことを示唆するものと考えられました(図15a)。

次に、2 μlの血液サンプルを用いて、長い断片の増幅を行いましたが、8.5 kbまでの明瞭な増幅を確認することができました(図15b)。

KOD FXは、これらの他にマウステールライセートを用いるようなPCRにおいても威力を発揮することが調べられています(Q&A参照)。

【プロトコール#1】KOD FXの基本反応条件

試薬	添加量(μl)	終濃度
2×PCR buffer for KOD FX	25	1×
2mM dNTPs	10	0.4 mM each
10pmol/μl Primer #1	1.5	0.3 μM
10pmol/μl Primer #2	1.5	0.3 μM
Template DNA	X	Genomic DNA : 〜200 ng/50μl Plasmid DNA : 〜50 ng/50μl cDNA : 〜200 ng(RNA相当量)/50 μl クルードサンプル : 〜2 μl
PCR grade water	Y	
KOD FX (1.0 U/μl)	1	1.0 U / 50 μl
Total	50 (μl)	

2ステップサイクル*　　3ステップサイクル

ステップダウンサイクル*

*プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

〈β-globin 1.3 kb〉
Primer F: 5' -TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC-3'
Primer R: 5' -CCAGGATTTTTGATGGGACACG-3'

〈β-globin 3.6 kb〉
Primer F: 5' -GGTGTTCCCTTGATGTAGCACA-3'
Primer R: 5' -ACATGTATTTGCATGGAAAACAACTC-3'

〈β-globin 8.5 kb〉
Primer F: 5' -TGATAGGCACTGACTCTCTGTCCCTTGGGCTGTTT-3'
Primer R: 5' -ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA-3'

図13 プライマーリスト

<Sample>
Jurkat細胞: $2×10^4$cells

図14 培養細胞を直接用いたヒトゲノムDNAの増幅

(a)

M : 1 kb Ladder Marker
<Sample>
1 : Whole blood 1 μl
2 : Whole blood 2 μl
3 : Whole blood 4 μl

(b)

M1 : 1 kb Ladder Marker
M2 : λ/*Hind* Ⅲ Marker
<Sample>
Whole blood 2 μl

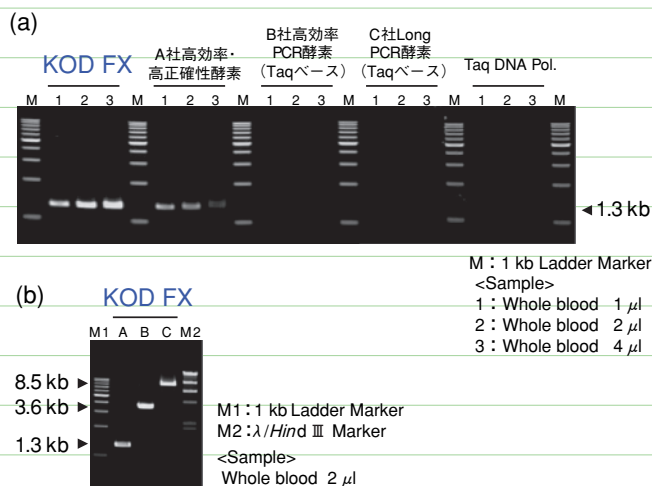



図15 血液を直接用いたヒトゲノムDNAの増幅

2-3 次なるSリーダーからの課題

その後、2人は何とか課題をやり終えることができました。それにしても、今回の課題は2人にとってかなりの教訓になりました。と、そこへSリーダーからのメールが届いたようです。添付ファイルを開いてみると次なる課題でした。

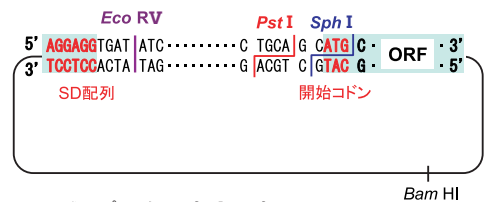
●次に示す発現ベクターのSD（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンの間にある余分な塩基を、なるべく簡単な方法を用いて取り除き、連結してください。

条件：●SD配列と開始コドン（ATG）の間を5～6塩基にすること。
●使用できる方法は以下のとおり。
- 各制限酵素での切断
- KOD DNA polymerase*を用いる末端の平滑化
- T4 DNAリガーゼによる結合
- PCR（任意の場所にプライマーを設計可能）
- T4 Polynucleotide Kinaseを用いるDNAのリン酸化

＊5'→3' DNA polymerase活性と3'→5'Exonuclease活性を有しています。

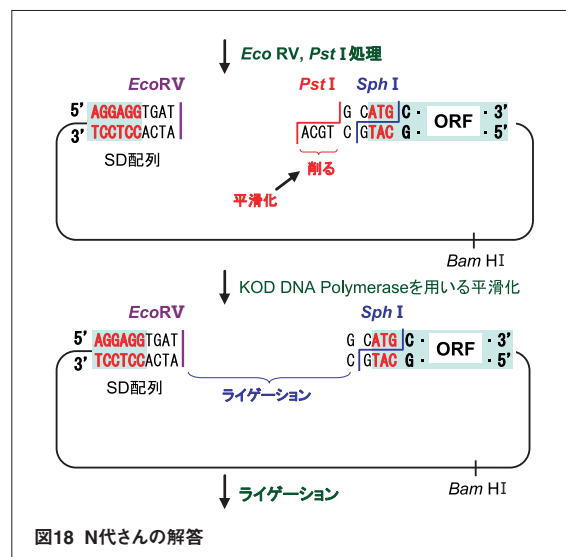
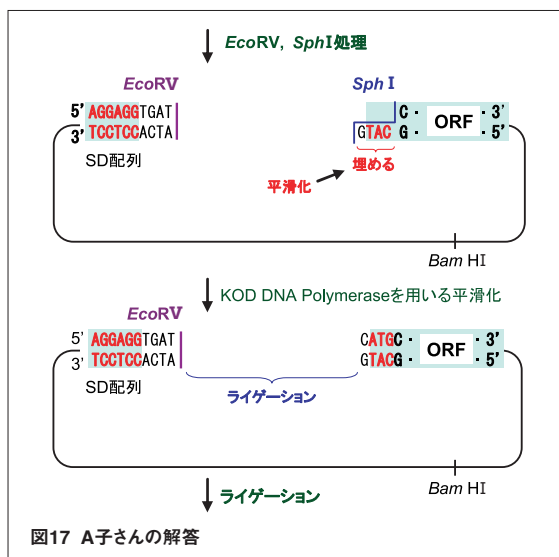
Eco RV　Pst I　Sph I
5' AGGAGGTGAT|ATC・・・・・・・・・C TGCA|G CATG|C・ ORF ・3'
3' TCCTCCACTA|TAG・・・・・・・・・G|ACGT C|GTAC G・ ・5'
SD配列　開始コドン
Bam HI

図16 発現プラスミドの部分配列

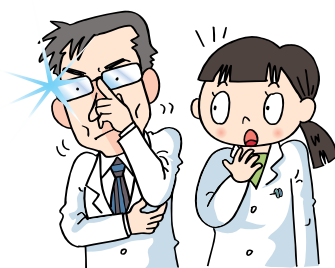
●上図に示した*Eco*RV、*Pst* I、*Sph* I、*Bam*HIの認識配列は、ここに示したサイト以外は存在しません。

A子さんとN代さんはこの課題を見て、制限酵素処理後に何らかの方法で連結することで最も簡単に課題を達成できるのではないかと考えたようです。確か、KOD DNA polymeraseは5'→3' DNA polymerase活性と3'→5'Exonuclease活性を有しているのでDNAの末端を平滑化でき、平滑化したサイト同士は直接連結できるはずです。

A子さんは、3'とか5'とか、DNAの方向性を考えるといつも混乱してしまうようで、質問用紙を上下逆さに見たりしています。一方、N代さんは、この質問を見切ったのか、不敵な笑みを浮かべています。結局、2人は以下のような方法を考え出しました（図17、18）。2人の方法では、確かにSD配列と開始コドンの間は5～6塩基になるようです。

図17 A子さんの解答

図18 N代さんの解答

2人の解答を見た瞬間、またしてもSリーダーのメガネがきらりと輝きました。

その横で、アシスタントのS本さんはなにやら胸騒ぎがしています。「もしかして…、この解答には思いもかけない罠が仕掛けてあるのでは?」と。そしてS本さんは、なんとなく、2人が選択しなかったPCRとT4 Polynucleaotide kinaseを用いるのではないかと思いました。

さて、皆さんなら、どのような方法を用いますか？ では、次回お会いしましょう。

みなさんも2人の解答が正しいかどうかを、吟味してみてください。【注意:2人の解答には間違いが含まれている可能性がありますので、上の図を実験の参考にはしないでください。】

2人の解答の解説は、次号「PCR実戦技術編（3）」でお届けする予定です。

次回、乞うご期待!!

A子さん
KOD FXを用いてクルードサンプルから増幅する場合、どのような注意点がありますか？

Sリーダー

KOD FXは、培養細胞、血液、マウステールライセートなど、様々なクルードサンプルを用いるPCRへ応用することが可能です。その際の注意点としては、サンプルを持ち込み過ぎないことが重要です。液量としては、反応液50 µlに対して最大5 µl、好ましくは2 µl程度にすることで良好な結果を得ることができます。

マウステールの増幅では、適切な方法で前処理したものを用いることが好ましいといえます。一般的には、Proteinase Kを用いる方法で処理することが多いのですが、クルードサンプルに強いKOD FXでは、アルカリ溶解法を用いて簡便に作製したライセート上清を用いることも可能です。

●マウステールライセートの調製方法（アルカリ溶解法）

マウステール約3 mm
↓ ←50 mM NaOH 180 µlを加え、Vortexにて良く攪拌
95℃, 10 min. インキュベート
↓ ←1M Tris-HCl（pH8.0） 20 µlを加え、Vortexにて良く攪拌
12,000 rpm, 10 min. 遠心
↓
上清回収
↓
0.5〜2 µlをPCR（50 µl）へ

※本方法ではマウステールは完全には溶解しません。
※熱アルカリ溶液の取扱いに十分ご注意ください。

A子さん
KOD FXの正確性はどの程度ですか？

Sリーダー

Taq DNA polymeraseの約11倍です。増幅産物の末端は平滑化されています。よって、PCR産物は直接TAクローニングすることはできません。専用のTArget Clone™-Plus-（Code No. TAK-201）を用いることによって、高効率にTAクローニングすることが可能です。

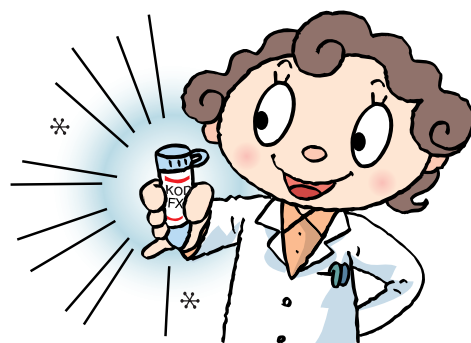
ちなみにKOD -Plus-とKOD -Plus- Ver.2の正確性はTaqの約80倍であり、こちらの方がクローニング用途には適しています。

A子さん
KOD FXに用いるプライマーの注意点を教えてください。

Sリーダー

KOD FXに限らず、KOD -Plus-やKOD -Plus- Ver.2の場合も同様に、アニーリング温度はプライマーのTm値-5〜10℃程度を目安にします。よって、2ステップサイクルやステップダウンサイクルの場合、プライマーのTm値は少なくとも73℃程度は必要です。

2ステップサイクルやステップダウンサイクルはクルードサンプルを用いるPCRや10kbを超える長いターゲットの増幅に有効であることが分かっています。

また、特に長いターゲット（>10kb）の場合に用いるプライマーは、脱塩グレードのものではスメアや非特異増幅が見られる場合があるため、少なくとも、カートリッジ精製やHPLC精製グレードのものを使用する必要があります。

関連製品紹介

品　名	用　途	包　装	Code No.	価　格
KOD -Plus-	高正確PCR	200U×1本	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus- Ver.2	〃　（さらに高効率）	200U×1本	KOD-211	¥32,000
KOD FX	高成功率PCR	200U×1本	KFX-101	¥35,000
KOD Dash	インサートチェック	250U×1本	LDP-101	¥25,000
Blend Taq®	正確性の不要なPCR全般	250U×1本	BTQ-101	¥19,000
Blend Taq® -Plus-	〃　（Hot start可能）	250U×1本	BTQ-201	¥21,000
ReverTra Ace -α-®	高効率逆転写	100回用	FSK-101	¥53,000
Ligation high Ver.2	高効率Ligation	750µl×1本	LGK-201	¥22,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	DNA断片の精製	200回用	NPK-601	¥28,000
T4 Polynucleotide kinase	DNAのリン酸化	1,500U×1本	PNK-111	¥15,000
rATP	リン酸化の基質	50µmoles/0.5ml	ATP-111	¥15,000
E. coli Alkaline Phosphatase	脱リン酸化	100U×1本	BAP-111	¥15,000
MagExtractor™ -Plasmid-	プラスミドの精製	500回用	NPK-301	¥33,000
Magical Trapper	磁性分離（磁性スタンド）	1個	MGS-101	¥38,000
TArget Clone™	TA Cloning vector	10回用	TAK-101	¥12,000
TArget Clone™ -Plus-	〃　（KOD専用）	10回用	TAK-201	¥16,000
Competent high JM109	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-900	¥17,000
Competent high DH5α	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-903	¥17,000
Competent Quick DH5α	サブクローニング用	0.1ml×20本	DNA-913	¥29,000

CLIP-tag

SNAP-tagにニューフェースの登場です。2重ラベルが可能になりました。

CLIP-tagは、SNAP-tag（Human O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase [hAGT]を遺伝子工学的手法により改変）をさらに改変した酵素タグ（約20kDa）であり、benzylcytosine（CT）誘導体を基質として反応し、その基質の一部（蛍光基などと）共有結合を形成します。従来のSNAP-tagはbenzylguanine（BG）誘導体を認識するため、SNAP-tagとCLIP-tag融合タンパク質を用いる2重ラベルが可能になりました。目的タンパク質のN末端、もしくはC末端に融合して使用します。

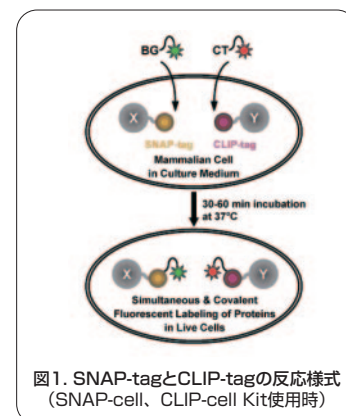



図1. SNAP-tagとCLIP-tagの反応様式
（SNAP-cell、CLIP-cell Kit使用時）

特長1 SNAP-tagとの2重ラベル

・SNAP-tagとは別の基質と反応するため、CLIP-tagとSNAP-tagを用いて2重ラベルすることができます。

特長2 高い特異性

・CT誘導体は細胞成分との反応性がほとんどありません。

特長3 広い応用性

・CLIP-cell（細胞用）、CLIP-vitro・vista（蛍光タンパク質作製用）、CLIP-Biotin（ビオチン化タンパク質作製用）、CLIP-tag building block（表面化学用）から選択いただけます。

※それぞれSNAP-tag用もご用意しております。

実施例1 CLIP-tagとSNAP-tag融合タンパク質の2重ラベル例

N末端CLIP-tag融合プロテインキナーゼMEK1（CLIP-MEK1）とC末端SNAP-tag融合histone H2B（H2B-SNAP）をCHO細胞で様々に発現させた後、CT-TMR基質[CLIP-cell TMR Kit]（赤）及びBG-505基質[SNAP-cell 505Kit]（緑）と30分間反応させ、細胞を洗浄後、検出を行いました。その結果、それぞれのタンパク質は、細胞質（赤）と核（緑）に局在することが分かりました。

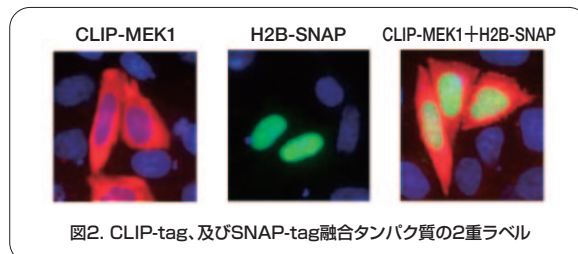



図2. CLIP-tag、及びSNAP-tag融合タンパク質の2重ラベル

参考文献 A. Gautier et al., *Chemistry & Biology*, **15**: 128-136 (2008)

	品　名	備　考	包装	保存温度	Code No.	価　格
危	CLIP-cell Trial Kit*	CT-TMR, CT-505, CLIP-cell Block ,pCEMS1-H2B-CLIP10m control plasmidを含みます。	1kit	-20℃	CVLK339	￥25,000
危	CLIP-cell 360 Starter Kit	Ex357nm, 437nm（DAPI filter）〈青〉	1kit	-20℃	CVSK326	￥95,000
危	CLIP-cell 430 Starter Kit	Ex421nm, Em444, 487nm（Blue laser filter用）〈青〉	1kit	-20℃	CVSK328	￥95,000
危	CLIP-cell 505 Starter Kit	Ex504nm, Em532nm（fluorescein filter用）〈緑〉	1kit	-20℃	CVSK332	￥95,000
危	CLIP-cell PF Starter Kit	Ex500nm, Em 532nm（fluorescein filter用）〈緑〉	1kit	-20℃	CVSK330	￥95,000
危	CLIP-cell TMR Starter Kit	Ex554nm, Em580nm（rhodamine filter用）〈赤〉	1kit	-20℃	CVSK334	￥95,000
危	CLIP-tag Cell Surface Trial Kit	CT-488, CT-547, pCEMS1-CLIP10m-NK1R control plasmidを含みます。	1kit	-20℃	CVLK347	￥44,000
危	CLIP-block cell	-	1kit	-20℃	CVBK340	￥35,000
危	CLIP-biotin 100-Kit	-	1kit	-20℃	CVLK336	￥66,000
危	CLIP-vitro 488 50-Kit	Ex506nm, Em526nm（flurorescein filter用）	1kit	-20℃	CVLK341	￥95,000
危	CLIP-vitro 547 50-Kit	Ex554nm, Em568nm（TAMRA or C3 filter用）	1kit	-20℃	CVLK343	￥95,000
危	CLIP-vitro 647 50-Kit	Ex660nm, Em673nnm（650 nm diode laser用）	1kit	-20℃	CVLK345	￥95,000
危	CLIP-vista Green 50-Kit	Ex500nm, Em524nnm（488nm fluorescence sensor用）	1kit	-20℃	CVLK349	￥25,000
	CT-GLA-NHS	CLIP-tag building block	2mg	-20℃	CVBB353	￥52,000
	CT-NH_2	CLIP-tag building block	2mg	-20℃	CVBB351	￥52,000
	CLIP-source plasmid pCLIP10m	CLIP-tag配列切り出し用（哺乳類細胞用）	1kit	室温	CVPL323	￥27,000
	CLIP-express Mammalian Stable Expression Plasmid Kit*	哺乳類細胞用発現プラスミド*	1kit	室温	CVPL324	￥52,000

危:本キットのパーツには、消防法における第4類第3石油類（等級Ⅲ）であるジメチルスルホキシド（DMSO）が含まれます。
※本製品の詳細につきましてはwww.covalys.comをご覧ください。
※それぞれ大容量キットを準備しております。また、すべての商品に関して、SNAP-tagバージョンがございます。弊社ウェブサイトをご覧ください（www.toyobo.co.jp/bio）。
※CLIP-tagの研究用途での使用に際しましては書面での契約等は一切必要ありません。研究用途以外で使用する場合は弊社までお問い合わせください。
※使用する基質・リガンドをCovalys社以外で作製、入手する場合は別途ライセンス契約の必要があります。詳細につきましては弊社までお問い合わせください。
＊3種類のプラスミドを含みます。発現プラスミド:pCEMS1-CLIP10m はCLIP-tagの上流および下流にマルチクローニングサイトがあり、N末およびC末にSNAP-Tagを融合することができます。CMVプロモーターを有しており、一過性発現用にお使いいただけます。CLIP-tagのcodon usageは哺乳類型になっています。また、本製品にはコントロールプラスミドとして、pCEMS1-H2B-CLIP10m（核タンパク質を発現）とpCEMS1-CLIP10m-NK1R（膜タンパク質を発現）が供給されます。

HOT ITEM

Santa Cruz Biotechnology社試薬

シグナル伝達系解析試薬をはじめ、多数取りそろえております。

Santa Cruz Biotechnology社では、10万種を超える、抗体、siRNA、RT-PCR用プライマーなど、様々な商品を販売しております。近年、幹細胞等の研究において、それらの細胞の分化状態によって発現するmRNAやタンパク質の解析が盛んになってきました。Santa Curz Biotechnology社では、それらの研究をサポート可能な商品を多数そろえております。下記リストにその一例をお示しします。是非、一度お試しください。

タンパク質名	抗　体		siRNA		RT-PCR Primer	
	ヒト用	マウス用	ヒト用	マウス用	ヒト用	マウス用
Oct3/4	SASC5279		SASC36123	SASC36124	SASC36123PR	SASC36124PR
Sox2	SASC17320		SASC38408	SASC38409	SASC38408PR	SASC38409PR
Nanog	SASC30331	SASC30329	SASC43958	SASC44833	SASC43958PR	SASC44833PR
E-Cadherin	SASC7870		SASC35242	SASC35243	SASC35242PR	SASC35243PR
TRA-1-60	SASC21705	-	-	-	-	-
TRA-1-81	SASC21706	-	-	-	-	-
Sall4	SASC46045		SASC45808	SASC45809	SASC45808PR	SASC45809PR
TERT	SASC7212		SASC36641	SASC36642	SASC36641PR	SASC36642PR
LIN28	SASC54030		SASC106829	-	SASC106829PR	-
vimemtin	SASC6260	SASC7557	SASC29522	SASC29523	SASC29522PR	SASC29523PR
SSEA-1	SASC21702		-	-	-	-
SSEA-3	SASC21703		-	-	-	-
SSEA-4	SASC59368		-	-	-	-

抗体　:保存温度4℃、　価格: ~~¥56,000~~ ➡ ¥49,000
siRNA　:保存温度-20℃、　価格: ~~¥55,000~~ ➡ ¥47,000
RT-PCR Primer :保存温度-20℃、　価格:　¥5,000

TOYOBO

キャンペーン 50%off

臨床情報添付

ヒト正常/病態組織由来cDNA

■期間：2008年7月14日～2008年9月25日
［ご注文分］
〈準備している製品がなくなりしだい終了させていただきます〉

正常人および各種疾患患者の組織由来のcDNAです。

ヒト正常/病態組織由来cDNAは、正常人あるいは各種疾患患者の組織から抽出したTotal RNAを鋳型として合成した1本鎖cDNAです。本製品を鋳型としてリアルタイムPCRを行うことで、疾患特異的または組織特異的な目的遺伝子の発現解析を行うことが可能です。また、目的遺伝子のクローニング用の鋳型としても用いることができます。

※本製品は諸般の事情により2008年9月25日をもって販売を終了することとなりました。長年に渡りお引き立ていただきましたことを心より御礼申し上げます。

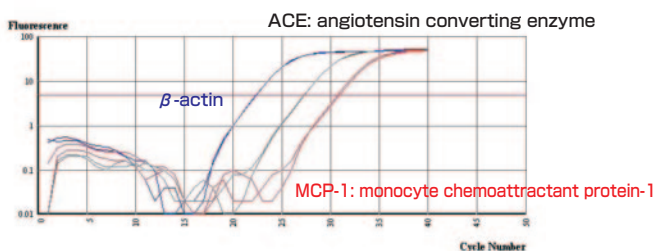
特長1 詳細な臨床情報を添付

・ヒト正常/病態組織由来cDNAには、詳細なドナーの臨床情報を添付しております。臨床情報には、ドナーの身体的特徴だけでなく、既往歴、投薬歴等に関する情報が含まれます。それぞれの組織で複数のロットから選択することが可能です（ご購入前に臨床情報をご確認いただけます。弊社ウェブサイト[www.toyobo.co.jp/bio]のキャンペーンページよりご請求いただけます）。　**※各ロットは1ドナーに対応します。**

◆倫理面での対応について：本製品の製造に用いたヒト組織由来Total RNAは、研究、臨床開発用途での使用を目的とした試料、関連情報の提供、保有に適用されるすべての法律、規則、ガイドラインに従って入手、提供されています。

特長2 簡便な操作

・リアルタイムPCRおよびPCRの鋳型として、そのまま、もしくは希釈して使用可能です。
※本製品は、高効率逆転写酵素『ReverTra Ace®』を用いて逆転写反応を行った溶液です。逆転写にはオリゴdTプライマーを用いています。製品には、逆転写反応に用いた成分が含まれます。

〈増幅曲線〉

〈リアルタイムPCR反応組成〉

D.W	2.2（μl）
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix（Code No.: QPK-201）	5
Primer F（10μM）	0.4
Primer R（10μM）	0.4
ヒト病態組織由来cDNA（糖尿病・腎臓）（200倍希釈）	2
	10（μl）

図1．SYBR® Greenアッセイによる各種遺伝子の増幅例　【測定装置:Bioflux LineGene（Code No.:BFFQD-33A）】

品　名	由　来	包　装*	保存温度	Code No.	価　格	キャンペーン価格
毒 ヒト正常組織由来cDNA（臨床情報添付）	すい臓	20回用	-80℃	DCPN-PC101	¥20,000	¥10,000
	腎臓	20回用	-80℃	DCPN-KD101	¥20,000	¥10,000
	筋肉**	20回用	-80℃	DCPN-MS101	¥20,000	¥10,000
	冠動脈	20回用	-80℃	DCPN-HT101	¥20,000	¥10,000
	大脳皮質	20回用	-80℃	DCPN-CC101	¥20,000	¥10,000
	海馬	20回用	-80℃	DCPN-HC101	¥20,000	¥10,000
毒 ヒト病態組織由来cDNA（臨床情報添付）	糖尿病・すい臓	20回用	-80℃	DCPD-PC101	¥20,000	¥10,000
	糖尿病・腎臓	20回用	-80℃	DCPD-KD101	¥20,000	¥10,000
	糖尿病・筋肉**	20回用	-80℃	DCPD-MS101	¥20,000	¥10,000
	糖尿病・肝臓	20回用	-80℃	DCPD-LV101	¥20,000	¥10,000
	高血圧・冠動脈	20回用	-80℃	DCPD-HT101	¥20,000	¥10,000
	高血圧・腎臓	20回用	-80℃	DCPD-KD201	¥20,000	¥10,000
	アルツハイマー病・大脳皮質	20回用	-80℃	DCPD-CC101	¥20,000	¥10,000
	COPD***・肺	20回用	-80℃	DCPD-LG101	¥20,000	¥10,000

毒:毒物および劇物取締法に基づく毒物である2-メルカプトエタノール（2-ME）を0.035mM含有しております。
*原液を1反応に1μl使用した場合の使用回数を示しています。適宜希釈してご使用いただけます。
製品1μlには、20ng相当のTotal RNAより逆転写されたcDNAを含みます。
**骨格筋　***COPD:慢性閉塞性肺疾患

臨床情報は事前にご覧いただけます。詳しくは弊社ウェブサイト[www.toyobo.co.jp/bio]のキャンペーンコーナーでご確認ください。

実験のコツ、失敗・成功談

皆様の日々の研究の中で、「こうやったら実験がうまくいった。皆この方法を使えばいいのに…」とか、逆に「あの方法には、実は○○○という欠点が潜んでいる。他の人が失敗しないように、伝えたいのだけれど…」といった思いを他人と共有したいという潜在的な要望をお持ちの方は意外と多くいらっしゃるのではないかと思います。このコーナーは、そのような皆様の事例を掲載させていただくことで、今まで共有できなかった情報を共有することを目的としています。

「簡単！ 細胞バラバラ法」 匿名希望 kssxさん

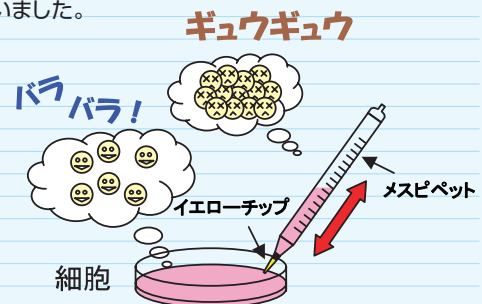
数々の実験に使用されている培養細胞。細胞がほぐれなくて、何度も何度もピペッティングしていませんか？ それでもほぐれない細胞はありませんか？ そんな、苦悩を一気に解決する方法を紹介します。

用意するものは10mlディスポーサブルピペット（5mlでも可、私はグライナー製を使っています）と黄色チップです。まず、トリプシンで細胞をはがし、培地を加えるところまでは今までどおりに行ってください。

さあ、ここからが本番です。深呼吸してください（とくに意味はありまん）。黄色チップを10mlピペットの先端に装着します。これで準備オッケー。あとはピペッティングするだけです。驚くほどほぐれます。ほぐれにくいHepG2でも5、6回でバラバラです。はじめて後輩に見せたら、『何十回やったんですか!!?』って驚いていました。

細胞がほぐれなくて困っていたらぜひ試してください！

ちなみに、これまで試してみたのは、HepG2、Cos1、Huh7、HeLaぐらいですが、細胞外刺激に弱い細胞以外は問題なく使えると思います。ラットの初代培養肝細胞も問題ありませんでした。トリプシンで凝集しちゃった場合なんかにも使える（細胞が全く同じ形質を保てるかはちょっとわかりませんが…）と思います。

編集部からのコメント:色々と試されて実績を積まれた方法のようですので、一度試してみる価値はありそうですね。特に、細胞をスクリーニングする場合などに力を発揮するはずです。

実験川柳特集 7

本コーナーは、弊社ウェブサイト（www.toyobo.co.jp/bio）「読者のコーナー」で最新の作品を確認いただけます。

> 七夕に　ボクのバンドは　流れ星
>
> 匿名希望　キミにあらびの冠を さん

●キミにあらびの冠をさんのコメント:スメアが流星のように。

【句評】PCRのスメアですね。我々の研究所では、この現象を「オーロラ」と呼んでとても恐れていました。それにしてもきれいな句ですね。夜空が目に浮かぶようです。

> なぜ消えぬ？　ノックダウンは俺の方
>
> 匿名希望　迷える苦学生 さん

●迷える苦学生さんのコメント: siRNAをトランスフェクションしても消えないむなしさを愚痴ってみました…

【句評】遺伝子のノックダウンと掛けたわけですね。でも、siRNA技術ってすばらしいですよね。最初に論文が出たときは、思わずウソ！ と思いましたが、本当でした。

> siRNA(エスアイ)の　結果次第で　俺も消え…
>
> 匿名希望　切り捨て御免 さん

【句評】まだ研究室にいらしたんですね!MASSが飛んだと思ったら(UPLOAD Vol.88参照)、今度はsiRNAですか。また試練が訪れたら投句をお願いします。

> 配列に　夢を絡めている　ヒト科
>
> 匿名希望　海光さん

【句評】うーん。これぞ、ロマンという感じの川柳ですね。確かに、遺伝子って単なる記号ですよね。でも、30億の内の1つが置換しただけで病気になることがあるわけですから、深く考えるとすごいことですよね。

⇒弊社ウェブサイト（読者のコーナー＞ご投稿コーナー）からご投稿、投句いただけます。

http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/tech/reader/contribute/index.html

採用になった方には、図書カード（実験のコツ、失敗・成功談:¥10,000、実験川柳:¥2,000）をご進呈いたします（詳しくはサイトをご覧ください）。奮って投稿・投句ください。

●Santa Cruz Biotechnology社製品値下げのご案内

2008年7月22日（火）よりSanta Cruz Biotechnology社製品が約10～15%程度値下げ（一部除く）となりました。抗体、siRNAなどがますますお求め安くなりました。是非ご利用ください。

●無細胞タンパク質合成キット「PROTEIOS™」の販売終了について

このたび弊社では「高効率コムギ胚芽無細胞タンパク質合成キット:PROTEIOS™」の販売を、2008年9月末日をもちまして終了させていただくことになりました。多年に渡りお引き立て賜りましたことを心よりお礼申し上げます。

【販売終了製品】

PROTEIOS™ Wheat germ cell-free protein synthesis kit ver.2

CPS-801M	5回用
CPS-801	20回用
CPS-803	60回用
CPS-202	PROTEIOS™ Buffer Set

【代替品情報】

詳しくは弊社ウェブサイト（www.toyobo.co.jp/bio）「お知らせ」コーナーをご覧ください。

●MultiReporter Assay System -Tripluc®- 購入申込書、契約書の変更に関して

MultiReporter Assay System -Tripluc®-の営利団体の購入申込書、契約書が6月から変更（実施許諾料:無償、試用期間:廃止）となり、ますます使いやすくなりました。詳しくは弊社ウェブサイト「お知らせ」コーナーをご覧ください。

●Emerald Luc pELucベクターのライセンスポリシー変更のお知らせ

これまで、当ベクター（Emerald Luc Vector Code No.; ELV-101, ELV-201）の使用において、弊社の検出用試薬（Emerald Luc Assay Reagent Code No.;ELA-101, ELA-102, ELA-201, D-Luciferin Code No.; MRL-101, MRL-101X5）を用いない場合は、ライセンス契約を必要としておりましたが、2008年6月より、この制度を廃止いたしました。弊社検出用試薬の使用如何にかかわらずライセンス契約は必要ありません。

ISO 9001 登録

東洋紡績株式会社の敦賀バイオ工場／敦賀バイオ研究所はLloyd,s Register Quality Assurance(LRQA)により日本はもとよりイギリス、アメリカ、オランダ、ドイツ、オーストラリアにおいてもISO 9001の認証登録されております。

本誌掲載の商品の内、本工場で製造されております制限酵素(Restriction Endonucleases)ならびに修飾酵素(Modifying Enzymes)は、品質マネジメント・システム沿って管理・運営・維持されております。

ISO 14001 登録

東洋紡績株式会社のつるが工場は環境マネジメントシステムに係る日本の認定機関である（財）日本適合性認定協会（JAB）に審査機関の認定を受けた日本検査キューエイ協会（JIC Quality Assurance Ltd.）によりISO14001の認証登録されております。東洋紡績株式会社敦賀バイオ事業所はつるが工場の環境マネジメントシステムの適用を受け活動を推進しており、敦賀バイオ事業所の製造するバイオ関連商品はISO14001の認証を受けた工場／研究所で開発、製造されています。

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

●PCR関連商品のラベルライセンスについての詳細は、弊社ウェブサイト（www.toyobo.co.jp/bio）をご覧ください。

●本ページ掲載の試薬類は全て一般研究用の目的にのみ販売しており、医薬品、診断用医薬品、化粧品、食品用等には使用できませんので、十分ご注意ください。誤用による事故については、当社は一切の責任を負いません。
●本ページ掲載商品にには消費税は含まれておりません。実際のご購入価格については弊社代理店へお問い合わせください。
●本ページ中の略号: 毒 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。
劇 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。
危 印は消防法に基づく危険物です。